

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年10月14日 (14.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/087897 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 5/00, A61F 2/14, A61L 27/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003848

(22) 国際出願日: 2004年3月22日 (22.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-096002 2003年3月31日 (31.03.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 高橋 政代 (TAKA-HASHI, Masayo). 笹井 芳樹 (SASAI, Yoshiki). 河崎 洋志 (KAWASAKI, Hiroshi). 大音 壮太郎 (OOTO, Sotaro).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PRODUCING LENS CELL AND LENS CELL OBTAINED BY THE METHOD

(54) 発明の名称: 水晶体細胞の作製方法、およびこの方法によって得られる水晶体細胞

(57) Abstract: A method of producing a lens cell comprising the ES cell-maintaining step wherein ES cells are maintained by using a medium containing fibroblast growth factor FGF-2 at a concentration of from 2 to 50 ng/ml, and the differentiation-inducing step following the ES cell-maintaining step wherein the ES cells are transplanted and cultured in mouse skull bone marrow cells PA6 at a cell density of from 2 to 6.5 colonies/cm<sup>2</sup> to thereby induce the differentiation of the ES cells into lens cells. It is preferred to further employ the step of washing the undifferentiated ES cells once with the use of an ES differentiation medium between the above-described ES cell-maintaining step and the above-described differentiation-inducing step.

(57) 要約: 本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を 2 ~ 50 ng/ml の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨髄細胞 PA6 上に 2 ~ 6.5 コロニー / cm<sup>2</sup> の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなるものである。また、上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、ES 分化培地を用いて未分化の ES 細胞を 1 回のみ洗浄する工程をさらに含むことが好ましい。

## 明 細 書

## 水晶体細胞の作製方法、およびこの方法によって得られる水晶体細胞

## 技術分野

本発明は、白内障などの眼疾患の治療に応用でき、胚性幹細胞（ES細胞）から水晶体細胞への分化を誘導することで水晶体細胞を作製する新規の方法、および、この作製方法によって得られる水晶体細胞に関するものである。

## 背景技術

白内障は、種々の原因で水晶体に混濁を生ずる疾患であり、水晶体の混濁によって視力低下を引き起こす重大な眼疾患である。現在の白内障の治療法としては、混濁した水晶体を水晶体嚢内から切除し、後嚢上に人工の眼内レンズを固定するという手術によるものが一般的である。この治療法に用いられる眼内レンズは、眼球の切開を小さくするためによりソフトなものへと改良が進められている。

しかしながら、この人工の眼内レンズでは、レンズ厚の調節は行えず本来生体の水晶体が有するような調節力を再現することができないのが現状である。そのため、眼内レンズを移植するという白内障手術では、水晶体の弾力性が低下して近くを見るときの焦点を合わせる調節機能が低下した状態である、所謂老眼（老視）状態を改善することはできない。また、若年者の白内障では、手術により一挙に老視化するために手術に踏み切れない例も多く存在する。

そこで、近年注目されている組織培養技術を利用してヒトの水晶体細胞を培養し、移植用の生体材料として使用すれば、上述の問題点が解決できると考えられるため、昨今盛んに研究が行われている。その一例として、特許文献1（米国特許第5,643,782号明細書）には、ヒト水晶体上皮細胞にハイブリッドアデノウイルスSV40を感染させることによって、また、特許文献2（米国特許第5,885,832号明細書）にはヒト水晶体上皮細胞に不死化遺伝子（SV40のラージT抗原をコードする遺伝子）を導入することによって、不死化したヒト水晶体上皮細胞を作製する方法が記載されている。

しかしながら、この特許文献1および2のように、細胞を不死化するということは、細胞が常に腫瘍化するという危険性もはらんでいる。また、アデノウイルス感染では、炎症を引き起こすという危険性も有している。

以上のように、生体材料として水晶体細胞を培養する技術に関する研究は盛んに行われているものの、今のところ、実際に生体材料として使用できるヒト水晶体細胞を作り出す方法は確立されていないのが現状である。

ところで、最近、靈長類やヒトにおいて胚性幹細胞（ES細胞）が単離され、これから医療として再生医学が注目されている（特許文献3：米国特許第5,843,780号明細書、特許文献4：米国特許第6,200,806号明細書参照）。この再生医学を利用することによって、ES細胞から水晶体細胞への誘導方法が確立できれば、水晶体細胞を嚢内へ注入することによって、調節力を持ったレンズを再生できる可能性があり、白内障と同時に老眼の治療も可能となる。また、このようなES

細胞由来の水晶体細胞は、上述の特許文献1および2のような細胞操作を行うものではなく、より本来の水晶体細胞に近いものであるため、生体材料への応用の可能性も高い。

非特許文献1 (Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S. et. al.,  
5 Induction of midbrain dopaminergic from ES cells by stromal  
cell-derived inducing activity, Neuron, 2000年、28巻、31-40  
頁)、非特許文献2 (Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K. et. al.,  
Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from  
10 primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity,  
Proc Natl Acad Sci USA, 2002年、99巻、1580-1585頁)には、ES  
細胞への分化誘導法としてSDIA法を用いて、神経細胞や網膜色素上  
皮細胞を産生することができると報告されている。しかしながら、上記  
文献に記載の方法では、均質な細胞群を再生することはできない。

20 このように、これまでのところ、実用に供する目的で、靈長類での水  
晶体の再生に成功した例はなく、その生産方法の確立が待たれている。  
そこで本発明は、ES細胞に分化を誘導することで水晶体細胞を安定し  
て作製する方法、および、この方法によって作製される水晶体細胞を提  
供する。

## 20 発明の開示

本願発明者等は、上記の問題点について銳意検討した結果、上記非特  
許文献1、2に記載のSDIA (Stromal-cell-Derived Inducing  
Activity) 法を応用し、そのES細胞維持条件や分化誘導条件を様々に  
変更することによって、水晶体細胞を安定して生産できることを見出し、

本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子 FGF-2 を  $2 \sim 50 \text{ ng/m}^2$  の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨細胞 PA6 上に  $2 \sim 6.5 \text{ コロニー/cm}^2$  の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とするものである。

上記の方法によれば、ES 細胞から水晶体細胞を安定して作製することができ、移植用生体材料としての利用可能性を有する水晶体細胞およびその水晶体細胞からなる水晶体線維組織を得ることができる。なお、この水晶体細胞およびその組織は、本明細書ではレントイドとも呼ぶ。上記の方法で作製された水晶体細胞およびその組織（レントイド）を移植用の生体材料として用いれば、従来の白内障の治療などに用いられる人工の眼内レンズとは異なって、本来の生体が有する水晶体厚の調節力と同様の調節力を有することができる。

さらに、上記の方法によって作製される ES 細胞由来の水晶体細胞は、上述の特許文献 1 および 2 のような細胞操作を行って得られるものではなく、より本来の水晶体細胞に近いものであるため、生体材料への応用の可能性も高い。また、上記の方法によって得られた水晶体細胞は、ES 細胞を利用した分化誘導に関する種々のメカニズムの解明に繋がるとともに、再生医療の発展に貢献することが期待され、非常に有用である。

また、本発明の水晶体細胞の作製方法は、上述の工程に加えて、上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、維持された上記 ES 細

胞を、E S 分化培地を用いて 1 回洗浄する洗浄工程をさらに含むことが好ましい。

上記の方法によれば、E S 細胞からの水晶体細胞への分化誘導をより良好に引き起こさせ、水晶体細胞を均質な細胞群として得ることができる。それゆえ、上記の方法によって得られた水晶体細胞は、生体材料としての利用可能性を有し、再生医療の発展に貢献することができる。

また、本発明の水晶体細胞の作製方法において、上記 E S 細胞は靈長類由来のものであることが好ましい。

上記の方法によれば、ヒトも靈長類に属するため、よりヒトの水晶体に近い水晶体細胞を容易かつ豊富に作製することができる。そのため、上記の方法によって作製された水晶体細胞は、ヒトにおける種々の眼疾患の治療薬の研究開発に有用である。なお、本発明の水晶体細胞の作製方法は、ヒトを含む靈長類の E S 細胞から水晶体細胞への分化誘導を成功させた初めての方法である。

なお、上記靈長類として具体的には、ヒト、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、カニクイザルなどが挙げられる。後述の実施例においては、カニクイザルの E S 細胞について、本発明の方法を用いて水晶体細胞が実際に分化誘導されており、靈長類の生体における水晶体の分化過程と同じような分化過程をたどることが確認されている。そのため、本発明の水晶体方法の作製方法は、カニクイザル由来のものであることがより好ましい。

また、本発明の水晶体細胞は、上述の方法によって作製されたものである。

上記の水晶体細胞は、E S 細胞から均質な細胞群として再生された

ものであるため、再生医療における移植用の生体材料の開発に有効利用することができる。本発明の水晶体の利用方法として具体的には、該水晶体細胞を水晶体嚢内に注入し、水晶体厚の調節が可能なソフトな水晶体を再生するという方法が考えられる。この方法は、白内障の治療に有用であるとともに、白内障と老眼を同時に治療できるという利点も有している。

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、次の説明によって明白になるであろう。

10

#### 図面の簡単な説明

図1 (a) ~図1 (d) は、本実施例において分化誘導されたレントトイドを位相差顕微鏡によって観察した結果を示す図である。

図2は、本実施例において分化誘導されたレントトイドを免疫染色した結果を示す図である。

図3 (a) および図3 (b) は、本実施例で分化誘導された細胞について、タンパク質の発現を調査したウエスタンプロット解析の結果を示す図である。図3 (a) はクリスタリンアルファAの発現を、図3 (b) はPax6の発現を、それぞれ調査したものである。

図4は、未分化ES細胞を維持する際の培地中のFGF-2の濃度が、2、4、8ng/mlの各場合における誘導開始からの経過日数とレントトイドの誘導割合(%)との関係を示すグラフである。

図5は、ES細胞密度が高密度の場合、低密度の場合それぞれの、誘導開始からの経過日数とレントトイドの誘導割合(%)との関係を示

すグラフである。

図6は、ES細胞密度が高密度の場合、低密度の場合それぞれの、誘導開始から30日経過後におけるFGF-2の濃度に応じたレントイドの誘導割合(%)示すグラフである。

図7(a)は、高コロニー密度で培養した場合のレントイドを、顕微鏡で観察した結果を示す図である。図7(b)は、高コロニー密度で培養した場合の網膜の色素性上皮細胞を、顕微鏡で観察した結果を示す図である。

## 10 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明についてより具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

本発明の水晶体細胞の作製方法は、線維芽細胞増殖因子FGF-2を2~50ng/mlの濃度で含有する培地を用いてES細胞を維持するES細胞維持工程と、上記ES細胞維持工程の後に、上記ES細胞をマウス頭蓋骨細胞PA6上に2~6.5コロニー/cm<sup>2</sup>の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記ES細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とするものである。

この水晶体細胞の作製方法は、ES細胞を利用した分化誘導において、フィーダー細胞としてマウス頭蓋骨髄細胞PA6を用いるSDIA法を利用したものであり、特にヒトなどを含む霊長類のES細胞に対して適用することができる。そして、本発明の水晶体細胞の作製方法は、特に以下の3つの点に特徴を有している。

(1) 未分化状態のES細胞の維持に使用する培地に添加するFGF-

## 2 の最終濃度

(2) E S 細胞を P A 6 に植え付けるときの細胞密度

(3) E S 細胞を P A 6 に植え付ける前に実施される E S 細胞の洗浄の回数

5 ここで、上記 3 つの特徴点について順に説明する。先ず、(1) の未分化状態の E S 細胞の維持に使用する培地に添加する F G F - 2 の最終濃度について説明する。

10 本発明の水晶体細胞の作製方法においては、上記 E S 細胞維持工程において、線維芽細胞増殖因子 F G F - 2 を 2 ~ 5 0 n g / m l の濃度で含む培地を用いて E S 細胞を維持する。ここで E S 細胞を維持するとは、E S 細胞を未分化状態のまま維持することを意味し、この E S 細胞維持工程には、適宜 E S 細胞を継代することも含まれる。また、上記培地には、細胞を培養・維持することが可能な種々の培地が含まれるものとする。

15 そして、上記 E S 細胞維持工程においては、培地中の線維芽細胞増殖因子 F G F - 2 の最終濃度を 2 n g / m l 以上とすることで、後述の実施例にも示されるようにレントイドの分化を誘導することができる。また、上記 E S 細胞維持工程において、F G F - 2 の培地中の最終濃度が高くなり過ぎると、細胞増殖が強くなり維持が困難になるという弊害が発生するため、本発明では、F G F - 2 の最終濃度は 5 0 n g / m l 以下とする。

また、後述の実施例には、F G F - 2 の濃度が 2 n g / m l の場合よりも 4 n g / m l の場合の方が、レントイドの分化誘導がより促進され、さらに、4 n g / m l の場合よりも 8 n g / m l の場合の方が、レント

イドの分化誘導がより一層促進されること示されている。それゆえ、E S 細胞維持工程における線維芽細胞増殖因子 F G F - 2 の維持培地中の濃度は、4～50 ng / ml であることが好ましく、より良好な分化を誘導するためには、8～32 ng / ml であることがさらに好ましい。

5 E S 細胞の維持工程における F G F - 2 の濃度条件以外の各条件については、従来公知の方法に従って行えばよい。この維持方法の具体的な例としては、実施例に記載の方法を挙げることができる。

続いて、本発明の第2の特徴点である(2)のE S 細胞をP A 6 に植え付けるときの細胞密度について説明する。

10 通常、S D I A 法によるE S 細胞の分化誘導においては、E S 細胞の維持工程の後に、フィーダー細胞としてマウス頭蓋骨髄細胞P A 6 を用いてE S 細胞を植え付け、分化の誘導を行う。本発明の水晶体細胞の作製方法においては、この分化誘導工程において、未分化状態が維持されたE S 細胞の細胞密度を2～6. 5 (コロニー / cm<sup>2</sup>) として、フィーダー細胞P A 6 への植え付けを行う。なお、この細胞密度2～6. 5  
15 (コロニー / cm<sup>2</sup>) とは、P A 6 細胞を保有する内径10 cm の培養皿1枚におけるコロニー数に換算すると、約150～500コロニーとなる。すなわち、本発明の水晶体細胞の作成方法では、分化誘導工程におけるP A 6 細胞へのE S 細胞植え付け時の細胞密度を、150～50  
20 0 (コロニー / 内径10 cm の培養皿) とすると言い換えることもできる。

上記のように、P A 6 への植え付け時のE S 細胞密度を2 (コロニー / cm<sup>2</sup>) 以上とすることで、後述の実施例にも示されるように、特に靈長類などのE S 細胞から、水晶体細胞を分化誘導することができる。

また、上記 E S 細胞密度が高くなり過ぎると、 F G F - 2 の濃度の場合と同様に細胞の維持が困難になるという弊害が発生するため、本発明では、上記 E S 細胞密度の上限は 6.5 (コロニー /  $\text{cm}^2$ ) 以下とする。

また、本発明の水晶体細胞の作製方法における、 P A 6 細胞上への E S 細胞植え付け時の細胞密度は、 2.5 ~ 4.0 (コロニー /  $\text{cm}^2$ ) とすることがより好ましい。この細胞密度 2.5 ~ 4.0 (コロニー /  $\text{cm}^2$ ) とは、 P A 6 細胞を保有する内径 10 cm の培養皿 1 枚におけるコロニー数に換算すると、約 200 ~ 300 コロニーとなる。すなわち、本発明の水晶体細胞の作成方法では、分化誘導工程における P A 6 細胞への E S 細胞植え付け時の細胞密度を、 200 ~ 300 (コロニー / 内径 10 cm の培養皿) とすることが好ましい、と言い換えることもできる。なお、この細胞密度 200 ~ 300 (コロニー / 内径 10 cm の培養皿) という値は、神経誘導時における細胞密度の約 1.5 ~ 2 倍である。上記の細胞密度で植え付けを行うことによって、均質な水晶体細胞群をより安定して得ることができる。

なお、本発明の水晶体細胞の作製方法における分化誘導工程において、 E S 細胞を P A 6 上に植え付けた後の培養条件については、従来公知の E S 細胞における分化誘導時の培養条件に従えばよい。具体的には、培養温度は 34 ~ 38 °C が好ましく、培養 pH は pH 6.0 ~ 8.0 が好ましい。また、培養系については、静置培養、回転培養、浸透培養等を適宜選択することができる。

続いて、本発明のもう一つの特徴点である (3) の E S 細胞を P A 6 に植え付ける前に実施される E S 細胞の洗浄の回数について説明する。

この E S 細胞の洗浄については、本発明の水晶体細胞の作製方法にお

いて、ES細胞維持工程と分化誘導工程との間に実施される。そして、本発明では、ES細胞維持工程において未分化状態が維持されたES細胞を、ES分化培地を用いて1回のみ洗浄し、維持培地を洗い流すことが好ましい。

5 従来のSDIA法における未分化ES細胞の洗浄では、その回数は3回であったが、本発明では、この洗浄回数を3回から1回にすることによって、ES細胞からの水晶体細胞への分化誘導をより良好に引き起こさせ、水晶体細胞を均質な細胞群として得ることができる。

10 上記ES細胞の洗浄工程に用いられるES分化培地としては、上記ES細胞から水晶体細胞への分化誘導時に用いる分化誘導培地と同じものを使用することが好ましい。そして、使用される上記ES分化培地の量は、未分化ES細胞ペレットの体積の30～100倍であることが好ましい。

15 上述の水晶体細胞の作製方法によって、ES細胞から水晶体細胞の分化誘導を行えば、PA6細胞上での2～3週間の培養によって、水晶体細胞およびその組織（レントイド）を安定して得ることができる。

なお、後述の実施例においても示されるように、ES細胞維持培地におけるFGF-2の濃度、および、植え付け時のES細胞の細胞密度とともに増加させれば、分化の誘導は相乗的に高まる。それゆえ、上記FGF-2の濃度および上記ES細胞の細胞密度を、上述の範囲内でともに高くすれば、より良質な水晶体細胞を安定して作製することができる。

本発明の水晶体細胞の作製方法は、ヒトを含む靈長類のES細胞において実施されることが好ましい。本発明を靈長類のES細胞に適用すれば、ヒトの水晶体に近い水晶体細胞を容易かつ豊富に作製することができ

きるため、ヒトにおける種々の眼疾患の治療薬の研究開発に有用である。

また、本発明の水晶体細胞は、本発明の水晶体細胞の作製方法によって作製されたものであり、本発明の範囲内で条件を適宜変更させて作製された種々の水晶体細胞が含まれる。

5 本発明の水晶体細胞は、ES細胞の分化に関するメカニズムを解明や、白内障治療薬の研究開発に有用であるとともに、人工の眼内レンズよりもレンズ厚の調節能に優れた眼内レンズとして使用できる可能性を有している。

#### [実施例]

10 以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。本実施例では、靈長類のES細胞の一例として、カニクイザル (*Cynomolgus Monkey*) のES細胞を用いて水晶体細胞の分化誘導が実施された。

##### [1] 実験方法

15 本実施例は、以下の(1)から(4)に記載の方法で行われた。

###### (1) ES細胞の維持

先ず、本実験に用いられるカニクイザルのES細胞の入手方法について説明する。

ES細胞系は、従来文献 [Suemori H., Tada T., Torii R. et. al.,  
20 Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI, Dev Dyn., 2002年、  
222巻、273-279頁] の記載に基づいて、カニクイザルの胚盤胞から得られた。そして、その多能性が確認された。

未分化のES細胞は、マイトマイシンCによって不活性化されたマウ

ス胚性幹線維芽（S T O 細胞）のフィーダー層上に保持された。細胞は  
0. 1 mM 2-メルカプトエタノール（シグマ製）、1 0 0 0 U / m  
1 白血病抑制因子（E S G R O、ケミコン製）、2 0 % ノックアウト血清代替物（ギブコ製）、0. 1 mM 非必須アミノ酸（ギブコ製）、  
5 8 n g / m l 線維芽細胞増殖因子（F G F - 2、アップステート製）  
が補われたD M E M / F - 1 2 培地（シグマ製）で培養された。培地は  
毎日交換された。

その後、E S 細胞の継代は、0. 2 5 % トリプシンを含む1 mM C  
a C 1 <sub>2</sub> P B S 溶液、2 0 % ノックアウト血清代替物で処理された。  
10 そして、マウス頭蓋骨髄由来のP A 6 上に植え付ける3～4日前から、  
線維芽細胞増殖因子F G F - 2 が濃度2、4、8 n g / m l でそれぞれ  
添加された。

## （2）レントイドの誘導

続いて、F G F - 2 を各濃度で含有する培地上で維持されたE S 細胞  
15 について、以下のような手順で分化の誘導が実施された。

P A 6 はフィーダー細胞層として使用するために、ゼラチンコートさ  
れた培養皿に植え付けられた。トリプシン処理に続いて、部分的に分離  
されたE S 細胞群（3 0 - 5 0 個 / 1 群）は、ゼラチンでコートされた  
1 0 % F B S（ハイクローン製）を含むG M E M 培地（ギブコ製）上  
20 に播かれた。3 7 °Cで3 0 分間のインキュベートの後、E S 細胞はピペ  
ッティングによって分散された。遠心分離によって集められた細胞ペレ  
ットは、E S 分化培地〔1 0 % ノックアウト血清代替物、1 mM ピ  
ルビン酸（シグマ製）、0. 1 mM 非必須アミノ酸、0. 1 mM 2  
-メルカプトエタノール（和光製）〕とともに洗浄された。

その後、洗浄されたE S 細胞は、P A 6 フィーダー細胞層上に植え付けられ、分化の誘導が試みられた。なお、この植え付け工程では、P A 6 細胞上に植え付けられるE S 細胞の細胞密度が、高密度（2 0 0 コロニー以上／内径1 0 c mの培養皿）のものと、低密度（1 5 0 コロニー以下／内径1 0 c m 培養皿）のものの2種類が作製された。植え付けられたE S 細胞は、分化培地で少なくとも6 週間培養された。培地は3 日間ごとに交換された。

### （3）培養細胞の免疫組織化学的調査

上記（2）の方法で培養された細胞について、免疫組織化学的な調査が実施された。

細胞は4 % パラホルムアルデヒド（和光製）中で1 時間保持され、その後2 5 % スクロースP B S 中に浸された。0. 1 M リン酸バッファー（P B）で洗浄された後、試料は0. 0 0 5 % サポニン（0. 1 M P B - saponin、メルク製）を含む0. 1 M P B 中で2 0 % 脱脂粉乳とともに1 時間インキュベートされ、非特異的な抗体結合をブロックした。5 % 脱脂粉乳を含む0. 1 M P B - saponin で希釀された一次抗体とともに、試料は4 °Cで2 4 時間インキュベートされた。ウサギのポリクローナル抗クリスタリンアルファA（1 : 1 0 0 0、ストレスジェン製）が一次抗体として使用された。この抗体の活性は、ポジティブコントロールとしてラットのレンズを使用して確認された。0. 1 M P B での洗浄後に、試料は、5 % 脱脂粉乳を含む0. 1 M P B - saponin で希釀されたフルオレセイン共役ロバ抗ウサギ免疫グロブリン（1 : 1 0 0 、アマシャム製）二次抗体とともに室温で1 時間インキュベートされた。0. 1 M P B で洗浄した後、試料はグリセロール

－P B S (1 : 1) とともにスライドに固定され、レーザー自動読み取り共焦点顕微鏡（ライカ製）で観察された。

（4）S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンプロット解析

5 上記（2）の方法で培養された細胞について、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンプロット解析が実施された。

細胞はスクラッピングによって集められ、5 mM 2-メルカプトエタノール（和光製）を含む $500\mu l$ の溶解バッファー（レムリサンブルバッファー、バイオラッド製）中に溶解された。細胞懸濁液は氷上で均質化された。均質化された細胞は $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された。E S 細胞溶解物は電気泳動にかけられ、分離されたタンパク質は、P V D F 膜（Immobilom-P、ミリポア製）に転写された。非特異的抗体結合は、20%脱脂粉乳を含む0.1 M P Bとの1時間のインキュベーションによってブロックされた。プロットは5%脱脂粉乳を含む0.1 M P Bで希釈された一次抗体とともに室温でインキュベートされた。ウサギのポリクローナル抗体、抗クリスタリンアルファA（1 : 1000、ストレスジョン製）および、抗P a x 6（1 : 200、サンタクルーズ製）が、一次抗体として使用された。一次抗体結合は、A B C法に基づいてアルカリフォスファターゼ（1 : 100、ヴェクター製）と結合した抗ウサギI g Gを使用して検出された。0.1 M P Bで洗浄された後、プロットはプロトコルに従ってフォスファターゼ基質（コニカ免疫染色、コニカ製）とともに現像された。

〔2〕結果

続いて、上記の方法で行った本実験の実験結果を以下の（1）から

(4) に示す。

(1) レントイドの誘導について

PA 6 細胞上での 2 ~ 3 週間の培養によって、ES 細胞コロニー全体が色素沈着を引き起こすことなく成長し続ける分化細胞が作製された。

これらの細胞を位相差顕微鏡によって観察した結果を図 1 (a) から図 1 (d) に示す。図 1 (a) は、誘導開始から 30 日後の比較的小な細胞であり、図 1 (b) は、誘導開始から 53 日後の大きな細胞を観察した結果である。図 1 (a) および図 1 (b) に示すように、培養された細胞は、最終的に蓄積して大きさを変化させる透明体を形成した。なお、各図の右下に示すバーによって、その大きさがわかる。

図 2 には、分化誘導された細胞について、免疫染色を行った結果を示す。図 2において白く示される部分が、免疫染色によって染色された部分である。この結果から、分化誘導された細胞が抗クリスタリンアルファ A 抗体を有していることが確認され、分化誘導された細胞がクリスタリンアルファ A を発現していることが分かった。これによって、分化誘導された細胞はレントイドとして特徴付けられた。

また、いくつかのコロニーが、網膜色素性上皮細胞を形成することが確認された (図 1 (c) 参照)。網膜色素性上皮細胞のほとんどが、レントイドを含むコロニーから独立したコロニーにおいて発生した。実際の眼で確認されるのと同じ形状で、レントイドと網膜色素性上皮細胞とが一つのコロニー内に存在するものも見られた (図 1 (d) 参照)。

なお、このレントイドは、誘導開始から 14 ~ 16 日後に初めて確認された。レントイドを含むコロニーの比率は、誘導開始から 20 日後から次第に増加した。レントイドの数は、誘導開始から 40 日以内でピー

クに達した。

## (2) ウエスタンプロットティングによる解析結果

レントイドによるクリスタリンアルファAの発現が、ウエスタンプロット解析によってさらに調査された。具体的には、分化誘導から40日  
5 後のレントイドのタンパク質がPVDF膜に転写された後、電気泳動が行われ、抗クリスタリンアルファA抗体あるいは抗Pax6抗体の探査が行われた。

その結果を図3(a)および図3(b)に示す。図3(a)は、クリスタリンアルファAの発現を調査したウエスタンプロット解析結果であり、レーン1はポジティブコントロール(ラットの水晶体タンパク質)、レーン2はネガティブコントロール(ラットの神経幹細胞)、レーン3はSDIA法によるレントイドタンパク質の全量である。図3(b)は、  
10 Pax6の発現を調査したウエスタンプロット解析結果であり、レーン1はPax6細胞のタンパク質、レーン2は未分化のES細胞の全量タンパク質、レーン3はSDIA法によるレントイド細胞の全量タンパク質  
15 である。

図3(a)に示すように、ウサギ抗クリスタリンアルファAポリクローナル抗体は、22kDaのタンパク質を検知した。クリスタリンアルファタンパク質を示すシングルバンドは、レーン3のSDIA法によつ  
20 て分化誘導されたES細胞溶解液中では検出されたが、レーン2のネガティブコントロール(ラットの神経幹細胞)においては検出されなかつた。レーン1のポジティブコントロール(ラット水晶体タンパク質)においては、2つのバンド(22kDaと25kDa)が検出された。25kDaのバンドは、ラットの $\alpha$ -クリスタリンで発現し得る $\alpha$ -in-sと

思われる。

図3 (b) に示す P a x 6 の発現に関して言えば、ウサギ抗 P a x 6 抗体は、48 kDa の P a x タンパク質を検出した。P a x 6 は合成したレントイド内 (レーン3) においては発現するが、P A 6 フィーダー細胞 (レーン1) や未分化のE S 細胞 (レーン2) においては発現しないことが確認された。

従来文献 [Furuta Y., Hogan BL., BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo, Genes Dev, 1998年、12巻、3764-3775頁] に報告されているように、P a x 6 は水晶体の形成に必須である。眼胞と表皮外胚葉との相互作用における P a x 6 の発現は、水晶板の形成と、嵌入を誘導する。水晶体の前駆体に P a x 6 が欠如すると、水晶体の形成において欠陥が生じる。

本実験において、E S 細胞の分化からレントイドにおける P a x 6 の発現が導かれるということが確認された。P a x 6 は、E S 細胞からのレントイドの形成と、通常の発達の両方の機能を担う重要な因子であることが示唆される。また、この結果から、SDIA法によるE S 細胞の分化誘導によって、水晶体が形成されたことが裏付けられた。

### (3) レントイド誘導における外因性 F G F - 2 の影響について

続いて、霊長類のE S 細胞からのレントイドを誘導する場合における F G F - 2 濃度の影響を評価した。その結果を図4に示す。図4は、未分化E S 細胞を維持する際の培地中の F G F - 2 の濃度が、2、4、8 ng / ml の各場合における誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合 (%) との関係を示すグラフである。なお、図4では、 F G F - 2 の濃度が 2 ng / ml の場合を◆で示し、4 ng / ml の場合を■で

示し、8 ng / ml の場合を△で示している。

図4に示すように、誘導開始から20日間は、濃度の違いによる有意な差は見られなかった。誘導開始から30日以上経過後には、レントイドを含むコロニーのパーセンテージは、FGF-2濃度の増加に伴って用量依存的に増加した。本願発明者等はまた、FGF-2をES分化培地へ添加することを試みた。しかし、PA6細胞の成長があまりにも早すぎたため、分化するES細胞を維持することはできなかった（データ示さず）。

FGFが水晶体の分化と発達において重要な役割を果たし得るということは、いくつかの研究で報告されている。例えば、哺乳類においては、線維芽細胞成長因子（FGF）は、水晶体線維の分化を促進することが確認されている（参考文献 [Chamberlain CG., McAvoy JW., Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation, Curr Eye Res, 1987年、6巻、1165-1169頁]）。

FGF-1およびFGF-2は、発達段階においてマウスの神経網膜と水晶体細胞で発現し、FGFR（FGFレセプター）-1、および-2も水晶体細胞で発現する。

本実験では、未分化ES細胞維持培地におけるFGF-2濃度の増加が、レントイドの分化に影響を及ぼすことが示された。つまり、FGF-2の濃度を維持培地中に2 g / ml よりも多く含有させることで、その後のレントイドの分化誘導を促進させることができるということが確認された。この結果から、FGF-2は、SDIA培地での分化因子のレセプターを上方制御することによって、未分化ES細胞を分化因子に上手く応答させる可能性が示唆される。

## (4) レントイド誘導におけるコロニー密度の影響について

次に、P A 6 フィーダー細胞にE S 細胞を植え付ける場合のE S 細胞の細胞密度とレントイド誘導との関係を調べた結果を図5に示す。図5は、E S 細胞密度が高密度（200コロニー以上／10cmの培養皿：図5では■で示す）の場合、低密度（150コロニー以下／内径10cm培養皿：図5では◆で示す）の場合、それぞれの誘導開始からの経過日数とレントイドの誘導割合（%）との関係を示すグラフである。

図5に示すように、レントイドを含むコロニーのパーセンテージは、培養段階の開始時に添加されたE S コロニーの密度に比例して増加した。

また、図6には、誘導開始から30日経過後におけるF G F - 2 の濃度に応じたコロニー密度の影響を示す。図6のグラフでは、左から順にF G F - 2 の濃度が2ng／mlの場合、4ng／mlの場合、8ng／mlの場合のレントイドの誘導割合（%）を示し、また、各濃度のF G F - 2について、白色の棒グラフがコロニー密度の低いもの（150コロニー以下／内径10cm培養皿）、黒色の棒グラフがコロニー密度の高いもの（200コロニー以上／10cmの培養皿）を示している。

図6に示すように、誘導から30日後において、P A 6 細胞上に高密度（200コロニー以上／10cmの培養皿）で植え付けられた培養液中のE S 細胞分化によって誘導されたレントイドの数は、低密度（150コロニー以下／10cm培養皿）で植え付けられた場合のレントイドの数と比較して多かった。また、レントイド細胞の数は、誘導に先立つて植え付けられたE S 細胞の密度の増加に伴って直線的に増加することがわかった。同様の結果が誘導開始から40日後に観察された。しかしながら、20日では有意な差は観察されなかった。

なお、図7 (a) には、高コロニー密度で培養した場合のレントイドを、顕微鏡で観察した結果を示す。この図から、種々のレントイドがいくつかのコロニーによって形成されていることがわかる。右下のスケールバーは  $100 \mu m$  である。図7 (b) には、高コロニー密度で培養した場合の網膜の色素性上皮細胞を、顕微鏡で観察した結果を示す。この図から、矢印で示す網膜の色素性上皮細胞は、いくつかのコロニーによって形成されていることがわかる。右下のスケールバーは  $100 \mu m$  である。このように、網膜の色素性上皮細胞の誘導についても、コロニー密度が高い培養液で増加した。

以上の結果から、植え付けられたコロニーの密度は、レントイド誘導の量に影響を及ぼす可能性を示唆する。細胞間接触は、マウスの水晶体上皮細胞によるレントイドの形成に重要である。また、鶏のヒナの神経網膜の水晶体への分化転換も、幾層にも関連して混み合った状況下で起きる。このように、レントイドの形成は、混み合った状態で発生する傾向にあり、それゆえ、コロニー密度は重要な分化因子となり得る。コロニー密度は、網膜の色素性上皮細胞の分化量に影響を及ぼし得る。これらのデータは、コロニーが混み合った状態の場合に、その後に行われる S D I A 処理によって、眼球細胞がより形成されやすくなるということを示唆する。

本実験結果をまとめると、E S 細胞の維持過程において維持培地の F G F - 2 濃度を高くし、P A 6 上に植え付けられるE S 細胞のコロニー密度を高くして、S D I A 法を実施することによって、カニクイザルの E S 細胞から安定してレントイドを再生することができる事が確認された。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。  
5

### 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明の水晶体細胞の作製方法によれば、ES細胞から水晶体細胞を安定して作製することができ、移植用生体材料としての利用可能性を有する水晶体細胞およびその水晶体細胞からなる水晶体線維組織を得ることができる。上記の方法で作製された水晶体細胞は、ES細胞から均質な細胞群として再生されたものであるため、再生医療における移植用の生体材料の開発に有効利用することができる。  
10

本発明は、ヒトを含む霊長類のES細胞から水晶体への分化誘導を成功させた初めての例であり、ES細胞の分化に関するメカニズムを解明に寄与するという学術的意義を有するだけでなく、白内障治療薬の研究開発に役立てることができるという医薬分野の発展に寄与する可能性も有している。それゆえ、本発明の有用性は高い。  
15

## 請求の範囲

1. 線維芽細胞増殖因子 FGF - 2 を 2 ~ 50 (n g / m l) の濃度で含有する培地を用いて ES 細胞を維持する ES 細胞維持工程と、

5 上記 ES 細胞維持工程の後に、上記 ES 細胞をマウス頭蓋骨細胞 PA  
6 上に 2 ~ 6. 5 (コロニー / cm<sup>2</sup>) の細胞密度で植え付けて培養することによって、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化を誘導する分化誘導工程とを含んでなることを特徴とする水晶体細胞の作製方法。

10 2. 上記 ES 細胞維持工程と上記分化誘導工程との間に、維持された上記 ES 細胞を、 ES 分化培地を用いて 1 回洗浄する洗浄工程をさらに含むことを特徴とする請求の範囲 1 に記載の水晶体細胞の作製方法。

15 3. 上記 ES 分化培地は、上記 ES 細胞から水晶体細胞への分化誘導時に用いる分化誘導培地と同じものを用いることを特徴とする請求の範囲  
2 に記載の水晶体細胞の作製方法。

20 4. 上記 ES 細胞維持工程において、上記培地には線維芽細胞増殖因子 FGF - 2 が 4 ~ 50 n g / m l の濃度で含まれていることを特徴とする請求の範囲 1 ないし 3 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞の作製方法。

5. 上記分化誘導工程において、上記 PA 6 細胞へ上記 ES 細胞を植え付ける時の細胞密度を、 2. 5 ~ 4. 0 (コロニー / cm<sup>2</sup>) とすることを特徴とする請求の範囲 1 ないし 4 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞

の作製方法。

6. 上記 E S 細胞は、靈長類由来のものであることを特徴とする請求の範囲 1 ないし 5 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞の作製方法。

5

7. 上記 E S 細胞は、カニクイザル由来のものであることを特徴とする請求の範囲 6 に記載の水晶体細胞の作製方法。

8. 請求の範囲 1 ないし 7 の何れか 1 項に記載の水晶体細胞の作製方法

10 によって得られる水晶体細胞。

1 / 7

図 1 (a)

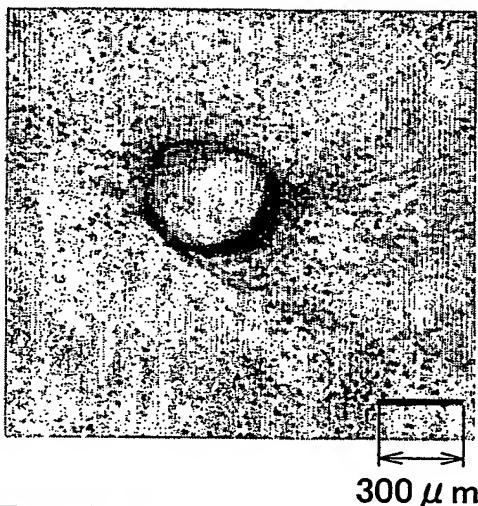


図 1 (b)

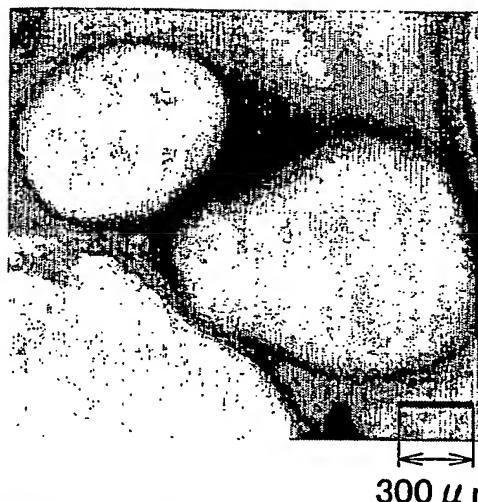


図 1 (c)

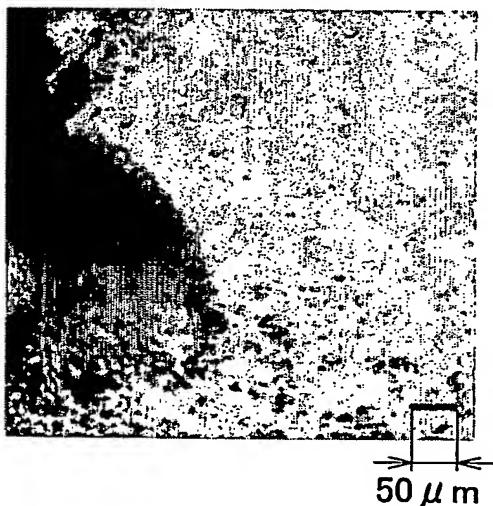
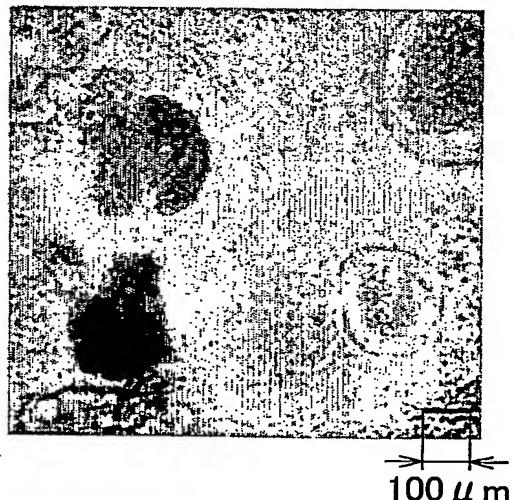
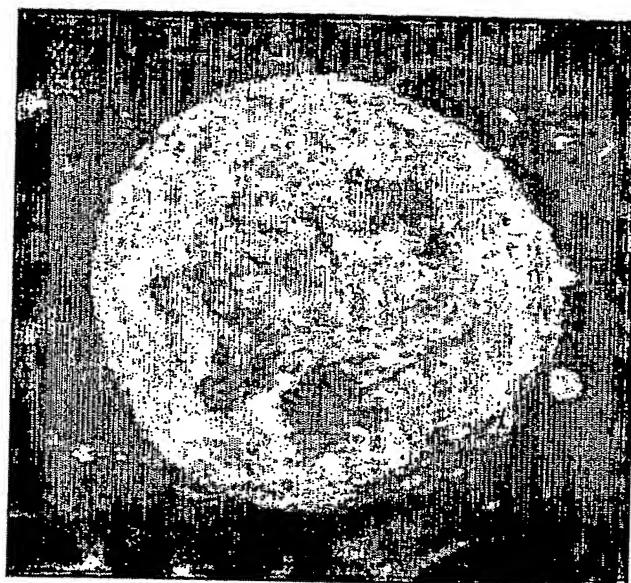


図 1 (d)



2 / 7

図 2



3 / 7

図3 (a)

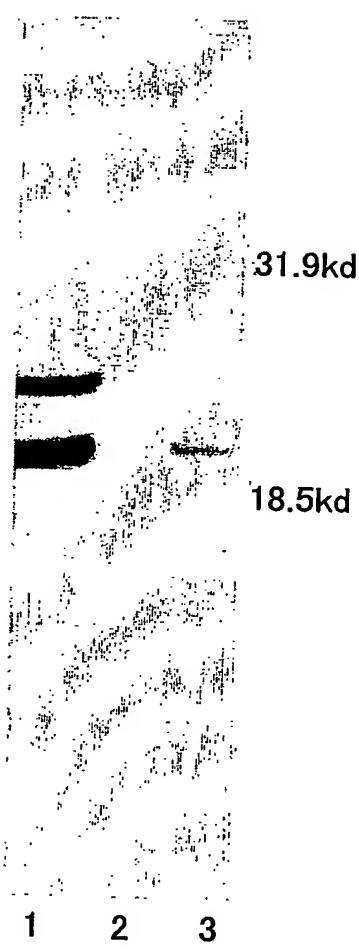
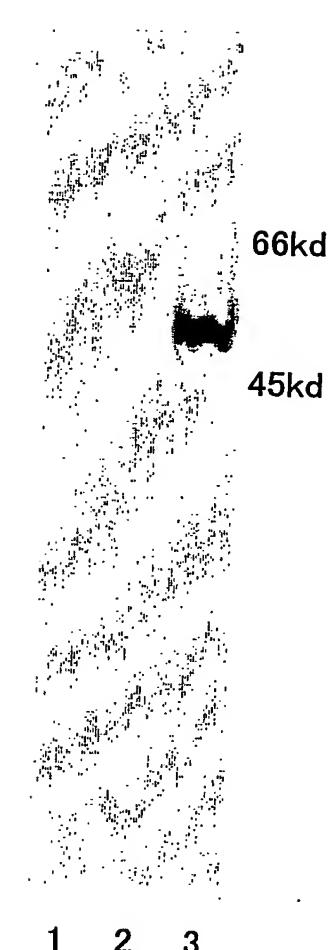
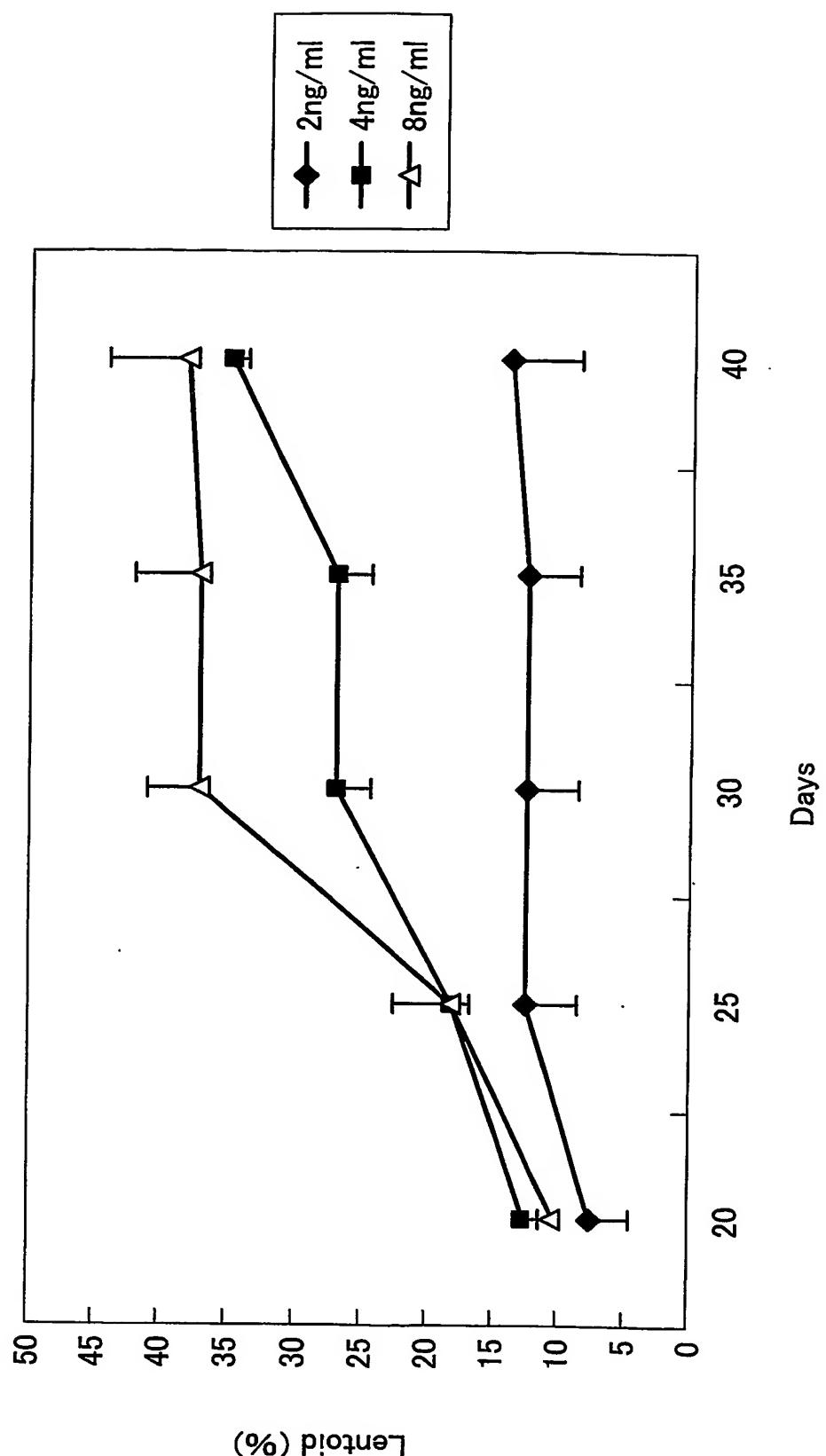


図3 (b)



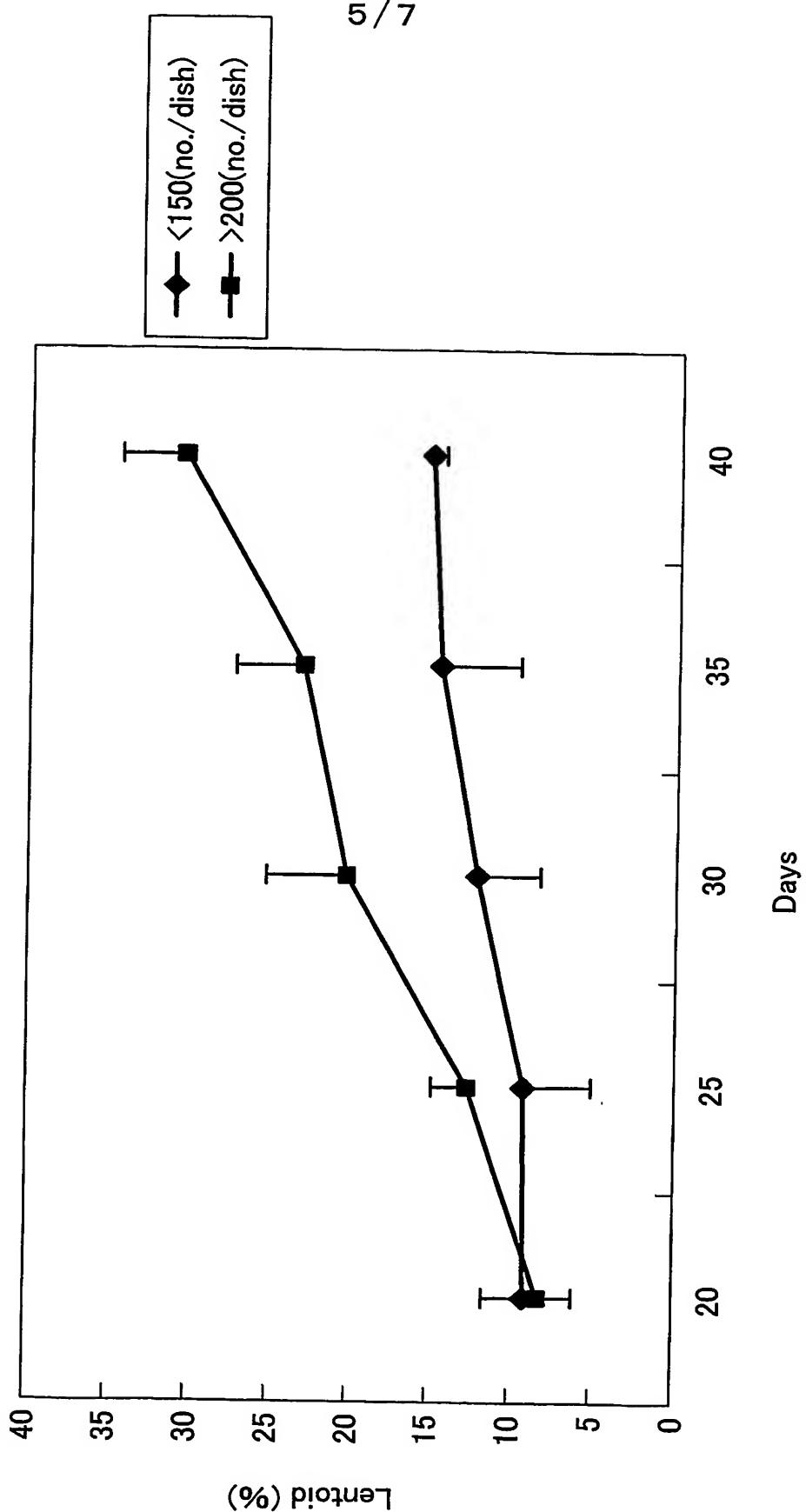
4 / 7

図 4

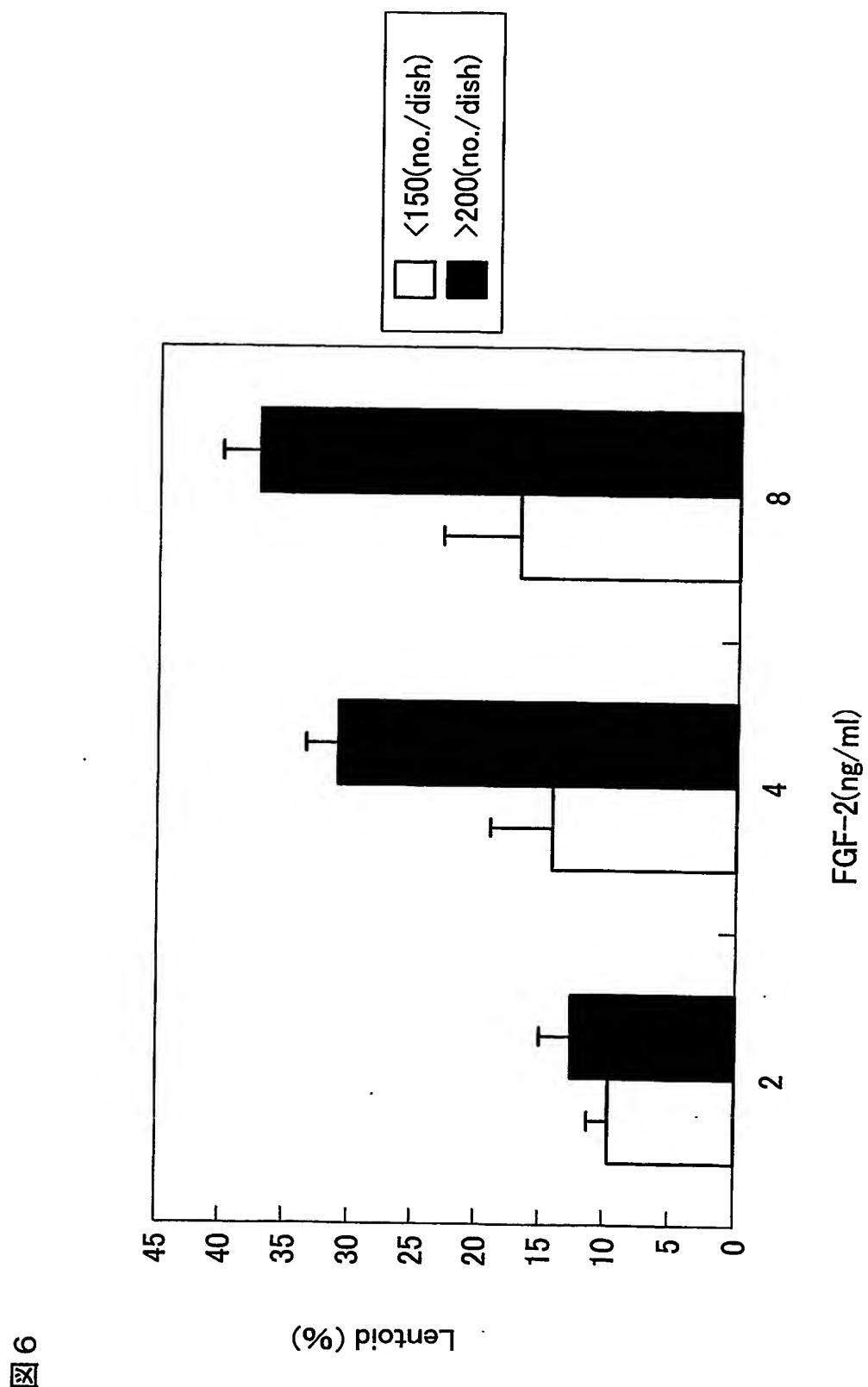


5 / 7

図5



6 / 7



7 / 7

図7 (a)

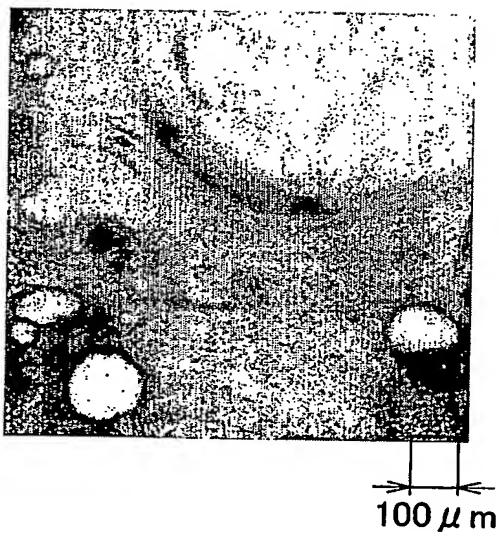
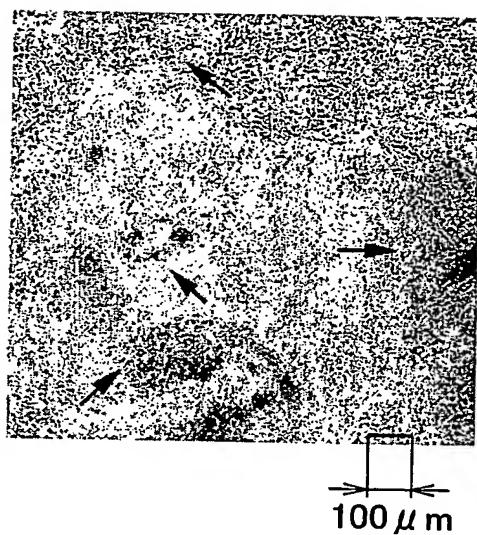


図7 (b)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003848

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/00, A61F2/14, A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/00, A61F2/14, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	OOTO; S. et al., Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells., Invest Ophthalmol Vis Sci., 2003 June, Vol.44(6), pages 2689 to 2693	1-8
P, A	Masayo TAKAHASHI, "Momaku no Saisei Iryo.", Saisei Iryo, 2003 August, Vol.2(3), pages 15 to 20	1-8
P, A	HIRANO, M. et al., Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells., Dev Dyn., 2003 December, Vol.228(4), pages 664 to 671	1-8
A	WO 02/38741 A (Bresagen Ltd.), 16 May, 2002 (16.05.02), & AU 1368402 A	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"B"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 April, 2004 (20.04.04)Date of mailing of the international search report  
11 May, 2004 (11.05.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003848

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAWASAKI, H. et al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 05 February, 2002 (05.02.02), Vol.99(3), pages 1580 to 1585	1-8
A	KAWASAKI, H. et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity., Neuron, 2000 October, Vol.28(1), pages 31 to 40	1-8
A	KAWAMORITA, M. et al., In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells after activation by retinoic acid., Hum.Cell., 2002 September, Vol.15(3), pages 178 to 182	1-8

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12N 5/00, A61F 2/14, A61L 27/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. 7 C12N 5/00, A61F 2/14, A61L 27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	OOTO, S et al., Induction of the differentiation of lentoids from primate embryonic stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Jun, vol. 44(6), pp. 2689-2693	1-8
PA	高橋政代, 網膜の再生医療. 再生医療. 2003 Aug, vol. 2(3), pp. 15-20	1-8
PA	HIRANO, M et al., Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells. Dev Dyn. 2003 Dec, vol. 228(4), pp. 664-671	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとつて自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

20. 04. 2004

## 国際調査報告の発送日

11. 5. 2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	WO 02/38741 A (Bresagen Limited) 2002. 05. 16 & AU 1368402 A	1-8
A	KAWASAKI, H et al., Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 5, vol. 99(3), pp. 1580-1585	1-8
A	KAWASAKI, H et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. Neuron. 2000 Oct, vol. 28(1), pp. 31-40	1-8
A	KAWAMORITA, M et al., In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells after activation by retinoic acid. Hum Cell. 2002 Sep, vol. 15(3), pp. 178-182	1-8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**